

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第 40、41 条)  
[PCT 18 条、PCT 規則 43、44]

出願人又は代理人 の書類記号	00PF210 -PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06560	国際出願日 (日.月.年) 25.09.00	優先日 (日.月.年) 27.09.99	
出願人 (氏名又は名称) 日本たばこ産業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第 41 条 (PCT 18 条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第 47 条 (PCT 規則 38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82, C12N5/14, C12N9/16,  
A01H5/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82, C12N5/14, C12N9/16,  
A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS), Genbank/EMBL/DDBJ/GenSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 96/30510, A1 (日本たばこ産業株式会社) 03.10月.1996 (03.10.96) &EP, 769553, A&US, 5801016, A&JP, 8-529172, A	1-9
Y	Desmond Mascarenhas et al. "Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize" Plant Molecular Biology(1990) Vol.15 No.6 p.913-920	1-9
A	WO, 97/47755, A (日本たばこ産業株式会社) 18.12月.1997 (18.12.97) &EP, 846770, A&JP, 10-501446, A	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31.10.00

国際調査報告の発送日

14.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村祥子



4N

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 4 月 5 日 (05.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/23544 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/11, Jun) [JP/JP]. 森岡真二 (MORIOKA, Shinji) [JP/JP]; 〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka (JP).  
15/63, 15/82, 5/14, 9/16, A01H 5/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06560
- (22) 国際出願日: 2000 年 9 月 25 日 (25.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/271762 1999 年 9 月 27 日 (27.09.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (74) 代理人: 谷川英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NUCLEIC ACID FRAGMENT, RECOMBINANT VECTOR CONTAINING THE SAME AND METHOD OF PROMOTING THE EXPRESSION OF STRUCTURAL GENE BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: 核酸断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた構造遺伝子の発現促進方法

(57) Abstract: A novel nucleic acid fragment having an excellent effect of promoting the expression of a structural gene located downstream; and a method of promoting the expression of the structural gene located downstream by using the same. Namely, a nucleic acid fragment having the base sequence represented by SEQ ID NO:1 in Sequence Listing or a nucleic acid fragment having a base sequence derived from the above-described base sequence by substitution, deletion, insertion or addition of one or more bases and having an effect of promoting the expression of a structural gene located downstream thereof.

(57) 要約:

下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果が優れた新規な核酸断片及びそれを用いてその下流の構造遺伝子の発現を促進する方法が開示されている。配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する核酸断片又は該塩基配列のうち 1 若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に 1 若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片を提供した。

WO 01/23544 A1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 明細書

核酸断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた構造遺伝子の発現促進方法

### 技術分野

5 本発明は、下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する機能を有する核酸断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた構造遺伝子の発現方法並びに該方法により所望の構造遺伝子の発現が促進された植物に関する。

### 背景技術

10 外来遺伝子の発現促進は、遺伝子工学の手法を植物に応用する際に最も必要とされる技術である。その技術のひとつに遺伝子発現の促進効果を有するDNA断片の利用がある。外来遺伝子の発現を促進するDNA断片としては、トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼのイントロン (Callis et al. Gene & Development 1, 1183-1200 (1987)) をはじめ、いくつかのイントロンが知られており (Simpson and Filipowicz 1996. Plant Mol. Biol. 32: 1-41)、また、イネのホスホリパーゼD (以下、「PLD」ということがある) の第1イントロン (国際公開公報W096/30510) も知られている。また、イントロン由来のDNA断片について、イントロンの内部配列を一部削除したり、あるいはイントロンの内部に同一のイントロンを挿入して発現促進作用へ及ぼす影響を調べた事例が報告されている (Mascarenhas et al. Plant Mol. Biol. 15, 913-920 (1990), Clancy et al. Plant Sci. 98, 151-161 (1994))。

20 しかしながら、現状では利用できるDNA断片の種類が限られており、個々のDNA断片の作用が植物の種類によって異なったり、さらに同じ植物でも器官や組織によって異なる (Simpson and Filipowicz 1996. Plant Mol. Biol. 32: 1-41) 等の理由から、様々な種類の発現促進作用を有するDNA断片の存在が望まれている。また、従来のDNA断片では、発現促進効果も不十分である場合が多いため、より効果の大きいDNA断片の存在が望まれている。

### 発明の開示

従って、本発明の目的は、下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果が

優れた新規な核酸断片及びそれを用いてその下流の構造遺伝子の発現を促進する方法を提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、イネのPLDの第2イントロンが、優れた遺伝子発現促進効果を有することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する核酸断片又は該塩基配列のうち1若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に1若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片を提供する。また、本発明は、配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する核酸断片又は該核酸断片とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の核酸断片と、該核酸断片の下流に位置する構造遺伝子とを少なくとも含み、前記核酸断片により、該構造遺伝子の発現が促進される組換えベクターを提供する。さらに、本発明は、構造遺伝子上流に上記本発明の核酸断片を挿入することから成る、構造遺伝子の発現促進方法を提供する。さらに、本発明は、所望の構造遺伝子の発現が促進された植物又は該形質を維持するその子孫を提供する。

本発明により、構造遺伝子の発現促進効果が優れた新規な核酸断片が提供された。下記実施例から明らかなように、本発明の核酸断片は、その下流の構造遺伝子の発現促進効果が、同様な機能を有する公知のイネPLD第1イントロンと比較しても桁違いに大きい。従って、本発明の核酸断片を構造遺伝子上流に挿入することにより、該構造遺伝子の発現が大幅に促進されるので、本発明は、例えば組換えベクターを用いた外来遺伝子の発現を大いに促進することができ、遺伝子工学の分野などにおいて大いに貢献するものと期待される。

#### 発明を実施するための最良の形態

上記のように、本発明の核酸断片は、配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する核酸断片又は該塩基配列のうち1若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に1若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断



片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片である。

上記の通り、配列番号 1 に示す塩基配列のうち 1 若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に 1 若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片(以下、便宜的に「修飾核酸断片」ということがある)も本発明の範囲に含まれる。この場合、修飾核酸断片中の、配列番号 1 記載の配列に対応する部分は、配列番号 1 記載の配列と 70%以上、さらに好ましくは 85%以上、さらに好ましくは 95%以上の相同性を有していることが好ましい。なお、塩基配列の相同性は、FASTA のような周知のコンピューターソフトを用いて容易に算出することができる。また、これらの修飾核酸は、配列番号 1 で示される塩基配列を有する核酸と、ストリンジェントな条件(すなわち、5 x Denhardt's reagent, 6 x SSC, 0.5% SDS 又は 0.1% SDS といった一般的なハイブリダイゼーション溶液を用いて 50~65℃で、好ましくは 50℃と 60℃の 2 段階、又は、50℃、55℃、60℃、65℃の 4 段階で反応を行なう)において、ハイブリダイズするものであることが好ましい。

また、配列番号 1 で示される塩基配列を有する核酸断片の一部であってその下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片も本願発明の範囲に含まれる。さらに、上記した本発明の核酸断片を複数連結したもののも、本願発明の範囲に含まれる。この場合、本発明の核酸断片を直接連結してもよいし、それらの間に他の配列が介在していてもよい。

本発明の核酸は DNA でも RNA でもよいが、安定性の観点から DNA が好ましい。

本発明の核酸断片は、本発明によりその塩基配列が明らかにされており、また、イネのゲノム由来であるので、イネのゲノミック DNA を鋳型とする PCR 等の核酸増幅法により容易に調製することができる。PCR はこの分野において周知であり、そのためのキット及び装置も市販されているので容易に実施することができる。また、上記修飾核酸断片は、このようにして得られた核酸断片を周知の

部位特異的変異法に付すことにより容易に調製することができる。

なお、本発明の核酸断片を複数連結する場合には、複数の本発明の核酸断片を予め連結してもよいし、本発明の核酸断片を含む領域に本発明の核酸断片を挿入してもよい。

- 5 構造遺伝子上流に上記した本発明の核酸断片を挿入することにより、該構造遺伝子の発現を促進することができる。構造遺伝子は、その上流に位置するプロモーターにより制御されるが、本発明の核酸断片は、プロモーターと構造遺伝子の間に挿入してもよいし、プロモーターの上流に挿入してもよいが、前者がより好ましい。この場合、本発明の核酸断片と構造遺伝子の距離は0 b p ~ 1 0 0 0
- 10 b p が好ましく、また、プロモーターと本発明の核酸断片との距離も0 b p ~ 1 0 0 0 b p が好ましい。

- 本発明はまた、上記本発明の方法を発現ベクターに適用して得られる組換えベクターを提供する。本発明の組換えベクターは、市販の発現ベクターのクローニング部位に本発明の核酸断片と、発現を促進すべき構造遺伝子とを挿入することにより容易に調製することができる。なお、このような発現ベクターは、植物用
- 15 発現ベクターが好ましく、種々のものがこの分野において周知であり、かつ市販されている。これらの発現ベクターは、宿主細胞内で複製するための複製開始点、プロモーター、外来遺伝子を挿入するための制限酵素部位を与えるクローニング部位及び薬剤耐性遺伝子等の選択マーカーを少なくとも含み、通常、転写を安定
- 20 に終了させるターミネーターを含む。本発明の方法においては、これらの公知の発現ベクターのいずれをも採用することができる。

- 上記の組換えベクターを用いて植物を常法により形質転換することにより、所望の構造遺伝子の発現が促進された植物を得ることができる。植物の形質転換方法自体はこの分野において周知であり、プロトプラストを用いたエレクトロポレーション法やアグロバクテリウム法等の周知の方法により行うことができる。
- 25

#### 実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

イネPLD遺伝子の第2イントロンおよび両端のエキソン37塩基ずつを含むDNA断片（その塩基配列を配列番号2に示す）を、次のプライマーを用い、公知のイネゲノムクローン（W095/0934の配列番号5）を鋳型として用いてPCRで増幅した。

5 5'-aagtcccccgggccgcccagcggaag-3'

3'-gacacccacagccgtctatagttcgta-5'

得られたPCR増幅断片をSma IとEco RVとで消化し、35Sプロモーターの下流に $\beta$ -Glucuronidase (GUS) 遺伝子を配したCLONTECH社製のベクターpBI221のSma I部位に挿入した。この操作により、上記増幅断片は、35SプロモーターとGUS遺伝子の間に配置される。一過的な遺伝子発現をSheenの方法(Sheen 1991, Plant Cell 3:225-245)によって調べた。すなわち、構築したプラスミドを、トウモロコシのエチオレートした葉から単離したプロトプラストへエレクトロポレーションによって導入し、GUSの一過的な発現を上記方法にて測定した。

15 なお、比較のため、イネPLD遺伝子の第1イントロン（配列表の配列番号3に示す）を国際公開公報W096/30510に記載された方法によりPCRで増幅し、上記と同様にpBI221のSma I部位に挿入し、トウモロコシに導入してGUSの発現を調べた。結果を下記表1に示す。

表 1

プラスミド	GUS 活性 (4-MU pmol/10 <sup>7</sup> 細胞/分)
pBI221 (35S プロモーター、GUS) (比較例)	140
pBI221 + PLD 第1イントロン (比較例)	630
pBI221 + PLD 第2イントロン (実施例)	11,000

20 この結果から明らかなように、本発明の核酸断片は、その下流の構造遺伝子の発現促進効果が、同様な機能を有する公知のイネPLD第1イントロンと比較しても桁違いに大きい。

## 請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する核酸断片又は該塩基配列のうち 1 若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に 1 若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片。  
5
2. 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列と 70% 以上の相同性を有する請求項 1 記載の核酸断片。
3. 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する核酸断片又は該核酸断片とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片。  
10
4. 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する核酸断片又は該核酸断片の一部であってその下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する請求項 1 記載の核酸断片。
5. 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する請求項 4 記載の核酸断片。
- 15 6. 配列表の配列番号 2 に示す塩基配列を有する請求項 1 記載の核酸断片。
7. 請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の核酸断片と、該核酸断片の下流に位置する構造遺伝子とを少なくとも含み、前記核酸断片により、該構造遺伝子の発現が促進される組換えベクター。
8. 構造遺伝子の上流に請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の核酸断片を  
20 挿入することから成る、構造遺伝子の発現促進方法。
9. 請求項 7 記載の方法により、所望の構造遺伝子の発現が促進された植物又は該形質を維持するその子孫。

1 / 3

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; JAPAN TOBACCO INC.

&lt;120&gt; Nucleic acid fragments, recombinant vectors containing the same and method for promoting expression of structural genes using the same

&lt;130&gt; 00PF210-PCT

&lt;160&gt; 5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 540

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa*

&lt;400&gt; 1

```
gttcggaccc ttctccttaa tctactcgtc ttgctcttg ctctttttct tttgtgtccc      60
tttcttgtgt gtgcgtttgc atgagcccga atttgatctg ctagtgaca gtacagtcag      120
atacactgaa acgatctgga aattctggat tattaggaaa aataaagagg tagtagacaa      180
gaattggaga tactttctat caagattggt ctattatgct tggccatttc ttgtttgacc      240
caagtacttc tttgaatcta gagtttgctg tgtgtgatgt ggtgtgtgtt tgtgtcacca      300
aaaatcttca ttagctaaaa ctgaaatttt atttattaac tgacctacta aaaatgtaga      360
gttctctgtg tgtgatgtgt gcttgtgtca ccaaaaatct tgatttgata gagtttttat      420
ttatttatta actgacctac tacaaatcta ttgctgtatg ctatgtgtgt ctgtatcacc      480
tgaaatgcaa tgtcttcttc ttgtttgttc ttgatctaac acgtgagctc atgtcaacag      540
```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 614

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa*

&lt;400&gt; 2

```
ccgcgccagc ggaagcgccc ccaagttcat ccgcaagggt cggacccttc tccttaatct      60
```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 3

actcgtcttt gctcttgctc ttttctttt gtgtcccttt cttgtgtgtg cgtttgcattg 120  
 agcccgaaatt tgatctgcta gtgcacagta cagtcagata cactgaaacg atctggaaat 180  
 tctggattat taggaaaaat aaagaggtag tagacaagaa ttggagatac tttctatcaa 240  
 gattggctcta ttatgcttgg ccatttcttg ttgacccaa gtacttcttt gaatctagag 300  
 tttgctgtgt gtgatgtggt gtgtgtttgt gtcaccaaaa atcttcatta gctaaaactg 360  
 aaattttatt tattaactga cctactaaaa atgtagagtt ctctgtgtgt gatgtgtgct 420  
 tgtgtcacca aaaatcttga tttgatagag tttttattta tttattaact gacctactac 480  
 aaatctattg ctgtatgcta tgtgtgtctg tatcacctga aatgcaatgt cttcttcttt 540  
 gttgttcttg atctaacacg tgagctcatg tcaacagttt gtggagggga ttgaggacac 600  
 tgtgggtgtc ggca 614

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 173

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa*

&lt;400&gt; 3

gtaagcccag tgtgcttagg ctaagcgcac tagagcttct tgctcgcttg cttcttctcc 60  
 gctcagatct gcttgcttgc ttgcttcgct agaaccctac tctgtgctgc gagtgtcgct 120  
 gcttcgtctt ccttctctcaa gttcgatctg attgtgtgtg tgggggggag cag 173

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa*

&lt;400&gt; 4

aagtcccccg ggccgcgccca gcggaag

27

&lt;210&gt; 5

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



3 / 3

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa*

&lt;400&gt; 5

atgcttgata tctgccgaca cccacag

27

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06560

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82, C12N5/14, C12N9/16, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82, C12N5/14, C12N9/16, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), Genbank/EMBJ/DDBJ/GeneSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 96/30510, A1 (JAPAN TOBACCO INC.), 03 October, 1996 (03.10.96) & EP, 769553, A & US, 5801016, A & JP, 8-529172, A	1-9
Y	Desmond Mascarenhas et al., "Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize", Plant Molecular Biology (1990) Vol.15 No.6 p.913-920	1-9
A	WO, 97/47755, A (JAPAN TOBACCO INC.), 18 December, 1997 (18.12.97) & EP, 846770, A & JP, 10-501446, A	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
31 October, 2000 (31.10.00)

Date of mailing of the international search report  
14 November, 2000 (14.11.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82, C12N5/14, C12N9/16,  
A01H5/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82, C12N5/14, C12N9/16,  
A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS), Genbank/EMBL/DDBJ/GenSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 96/30510, A1 (日本たばこ産業株式会社) 03. 10月. 1996 (03. 10. 96) &EP, 769553, A&US, 5801016, A&JP, 8-529172, A	1-9
Y	Desmond Mascarenhas et al. "Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize" Plant Molecular Biology(1990) Vol. 15 No. 6 p. 913-920	1-9
A	WO, 97/47755, A (日本たばこ産業株式会社) 18. 12月. 1997 (18. 12. 97) &EP, 846770, A&JP, 10-501446, A	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31. 10. 00

国際調査報告の発送日

14.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村祥子

4N

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**